

⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : 2 767 324

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : 97 10403

⑮ Int Cl⁶ : C 07 K 14/18, G 01 N 33/68, 33/569

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 14.08.97.

⑬ Priorité :

⑭ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 19.02.99 Bulletin 99/07.

⑮ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑯ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑰ Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

⑱ Inventeur(s) : DEUBEL VINCENT.

⑲ Titulaire(s) :

⑳ Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SA.

⑤④ UTILISATION DE PROTEINES D'ENVELOPPE RECOMBINANTES POUR LE DIAGNOSTIC DU VIRUS DE LA
DENGUE.

⑤⑦ L'invention concerne l'utilisation d'un ou plusieurs po-
lypeptides ou glycopeptides issus de la protéine E, pre M,
NS₁, NS₃ ou NS₅ de différents sérotypes de flaviviridae, no-
tamment de la dengue, et portant ou non à leur extrémité
carboxylée un résidu de 2 à 8 acides aminés choisis parmi
l'histidine, le tryptophane ou la cystéine à la fabrication
d'une trousse de diagnostic rapide de la détermination du
sérotipe incriminé dans une infection par le virus de la den-
gue, et à la nature primaire ou secondaire de ladite infection
spécifique des flaviviridae comprenant un polypeptide ou
glycopeptide éventuellement marqué issu de la protéine E,
pre M, NS₁, NS₃ ou NS₅ d'un virus de la famille des flavivi-
ridae et des anti-IgG, anti-IgM ou anti-IgA, soit non mar-
qués, soit marqués ou modifiés.

FR 2 767 324 - A1



La présente invention porte sur les moyens de différencier lors d'une infection par un virus de la famille des flaviviridae, notamment par le virus de la dengue, le type sérologique du virus incriminé ainsi que l'état primaire ou secondaire de ladite infection.

5 Les virus de la dengue sont transmis à l'homme par des moustiques du genre *Aedes*. L'Organisation Mondiale de la Santé estime à une centaine de millions le nombre d'individus affectés annuellement par la dengue et plusieurs dizaines de milliers en meurent, en particulier dans les régions intertropicales où vivent deux milliards de personnes à risque. Un
10 nombre croissant de touristes ou d'employés de sociétés étrangères s'infectent en se rendant dans les pays d'endémicité. Enfin, on compte par dizaines de milliers le nombre annuel de français vivant dans les DOM-TOM atteints par cette maladie.

La maladie, parfois asymptomatique, se caractérise
15 généralement par une forte fièvre accompagnée de maux de tête, de nausées et de douleurs articulaires et musculaires qui s'effacent après quelques jours sans laisser de séquelles. Les symptômes peuvent dans de rares cas s'intensifier pour conduire à des manifestations hémorragiques (DHF) dont l'issue peut être fatale lors d'un choc hypovolémique (DSS).
20 Les critères de gravité sont basés sur l'hémoconcentration, la thrombopénie, puis sur l'insuffisance cardiaque. On assiste actuellement à une aggravation des tableaux cliniques avec complications hépatiques et neurologiques. L'augmentation du nombre de cas de DHF/DSS, notamment
25 de variants viraux plus virulents, due sans doute en partie à une hypertransmission et à une propagation mondiale de l'espèce virale.

L'agent infectieux est le virus de la dengue appartenant à la famille des *Flaviviridae*, tout comme le virus de la fièvre jaune ou celui de l'encéphalite japonaise [Monath and Heinz, 1996]. On en connaît quatre
30 sérotypes, dengue 1 à 4. Ces virus sont enveloppés et possèdent un ARN

monocaténaire de 11.000 nucléotides, infectieux, associé à une protéine de capside C. L'enveloppe virale se compose des protéines de membrane M et d'enveloppe E. L'ARN viral code pour une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés qui s'individualise en trois protéines de structure et sept protéines non structurales NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 au cours de clivages co- et post-traductionnels par des protéases virales et cellulaires. Les protéines prM (précurseur de M), E et NS1 sont produites dans le réticulum endoplasmique et sont glycosylées. La fonction de NS1 au cours de la réplication virale n'est pas connue.

Les anticorps induits par l'infection virale possèdent quatre propriétés biologiques qui peuvent être mesurées *in vitro*: (1) les anticorps spécifiques de type, de complexe ou de groupe dirigés contre la protéine d'enveloppe E assurent la neutralisation du virus; (2) les anticorps anti-NS1 participent à la cytolysse médiée par le complément; (3) la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps ou ADCC; et (4) la facilitation dépendante d'anticorps. *In vivo*, il semblerait que les anticorps spécifiques du type viral puissent prévenir ou stopper une infection par la neutralisation du virus et par lyse des cellules infectées via l'activation du complément. La dengue hémorragique pourrait être une conséquence d'un phénomène immunologique mal connu, impliquant sans doute une cascade de cytokines liées à l'induction d'une immunité cellulaire cytotoxique de types CD4⁺ et CD8⁺ pouvant résulter d'une infection séquentielle par plusieurs sérotypes. Toutefois, l'apparition de manifestations hémorragiques chez des patients primo-infectés sans anticorps opsonisants suggère que d'autres facteurs comme le fond génétique de l'individu ou la virulence particulière des virus contribuent également aux manifestations graves de la maladie [Monath and Heinz, 1996].

Il a été montré par la demande de brevet n° WO 97/18311 que des peptides recombinants issus de chaque sérotype de flaviviridae,

notamment contre le virus de la dengue, modifiés de telle façon que leur extrémité carboxylée substituée par un peptide contenant 2 à 8 histidines tryptophanes ou cystéines, et de façon préférentielle 6 histidines, constituaient seuls ou en combinaison un excellent antigène immunogénique pouvant servir de base à la constitution d'un vaccin polyvalent. Ces polypeptides recombinants sont produits préférentiellement à partir de cellules d'insectes, produits dans le surnageant, et aisément purifiés sur colonne comportant un chélateur grâce à leur extrémité histidine. Le contenu du texte de cette demande est incorporé dans sa totalité par référence dans la présente demande.

Les membres des flavivirus (fièvre jaune, encéphalite japonaise, Zika, West Nile, dengue...) ont des sites antigéniques communs, révélés par le test d'inhibition d'héماغglutination (IHA) qui forme la base de la classification de ces virus. Le test de neutralisation, par contre, est plus discriminatif et peut être utilisé pour distinguer les virus entre eux et pour les classer en sous-groupes de virus voisins. Sur la base de réactions croisées à l'aide d'anticorps polyclonaux, les flavivirus ont été classés en 8 sérocomplexes [Calisher et al., 1989] comprenant 49 virus. Une vingtaine de virus n'ont pas d'apparenté antigénique spécifique suffisante pour appartenir à l'un de ces complexes. Cette classification a depuis lors été confirmée par l'analyse comparative des gènes codant pour la protéine d'enveloppe du virus ou de l'extrémité 3' non codante de plusieurs virus [Marin et al., 1995, Pierre et al., 1994]. Des sous-types antigéniques ont également été déterminés à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Composante majeure à la surface du virion, la protéine E induit des anticorps neutralisants et/ou inhibiteurs de l'héماغglutination et induit une immunité protectrice. La majorité des épitopes neutralisants présents sur la protéine E sont des épitopes discontinus.

Une faible activité neutralisante a été observée avec les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine prM. La capacité de la

protéine prM à induire une immunité protectrice a également été démontrée chez des souris vaccinées à l'aide de cette protéine.

La protéine NS1 forme des dimères dans les cellules infectées puis est exprimée à leur surface, mais elle est aussi sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme hexamérique. Elle induit des anticorps chez les sujets infectés. Chez le singe et la souris vaccinés, cette protéine peut même induire une immunité protectrice, les anticorps spécifiques intervenant sans doute dans un phénomène d'ADCC.

Des anticorps anti-NS3 ont été observés chez les sujets infectés, bien que cette protéine ait des fonctions intracellulaires (protéase, hélicase, NTPase) associées à sa localisation près des membranes du réticulum endoplasmique.

La protéine NS5 est la réplicase virale et peu d'anticorps apparaissent contre cette protéine chez les sujets infectés.

L'étiologie de la dengue est parfois délicate à affirmer lorsqu'un malade présente un syndrome fébrile indifférencié type "dengue-like" qui peut avoir comme origine un autre arbovirus, des virus provoquant des fièvres éruptives, la grippe, la leptospirose et même le paludisme. Seul un examen de laboratoire peut apporter le diagnostic. L'isolement du virus par culture en cellules de moustique et son identification sont des méthodes longues et nécessitant un prélèvement de sang précoce et conservé à température voisine de 0°C. La méthode RT-PCR n'est pas généralisée et demande une grande technicité.

Les méthodes sérologiques classiques d'IHA et de fixation du complément ont été remplacées par la technique ELISA de plus grande souplesse et plus sensible [Putnak et Henchal, 1990 ; Thongcharoen et al., 1993]. Plus particulièrement, des tests de capture d'anticorps de type MAC-ELISA (pour IgM antibody capture) ou GAC-ELISA (pour IgG antibody capture) ont été développés pour des diagnostics sérologiques de l'infection par le virus de la dengue (voir par exemple Kuno et al., 1991).

Les anticorps de type IgA n'ont pas été analysés spécifiquement dans ces tests.

L'antigène brut utilisé est un extrait de cerveau de souriceau infecté par les souches de référence de dengue 1 à dengue 4 ou encore des lignées cellulaires d'insectes (par exemple moustiques) ou de mammifères infectés par lesdits virus. Dans tous les cas, aucune interprétation valable ne pourra être donnée sur un seul échantillon de sérum. Il faut obligatoirement un deuxième sérum prélevé 10 à 15 jours après le premier échantillon. Un diagnostic de dengue ne pourra alors être avancé que s'il y a augmentation du titre en anticorps spécifiques.

La méthode de capture d'IgM associée à la méthode ELISA permet de détecter les témoins d'une infection active ou récente et de confirmer le diagnostic. Les IgM sont produites de façon passagère lors des primo-infections comme dans les infections secondaires. Cependant, le titre des IgM anti-dengue sont plus élevés lors des réactions primaires que des réactions secondaires. Le rapport IgM/IgG est donc utilisé dans de nombreux tests pour différencier une infection primaire d'une infection secondaire. Cette méthode développée par Kuno et al. (1991), tout comme la méthode ELISA, n'est pas spécifique du sérotype en cause, surtout lors des réactions secondaires.

Dans une primo-infection, le titre en anticorps s'élève lentement pour atteindre un niveau modeste. Le titre en anticorps est généralement plus élevé pour les antigènes du virus infectant que pour ceux des autres flavivirus. Dans les infections secondaires ou chez un sujet préalablement vacciné contre la fièvre jaune, le titre en anticorps s'élève rapidement pour atteindre des niveaux très élevés et l'on observe des réactions croisées vis-à-vis d'un large éventail d'antigènes de flavivirus. Le titre en anticorps acquis lors de la primo-infection est souvent plus élevé que celui des anticorps induits au cours de l'infection secondaire. En conséquence, le

résultat sérologique ne peut, en tout état de cause, qu'établir un diagnostic de présomption.

Lors d'une infection primaire, les anticorps de type IgM apparaissent dès le 5e jour après le début de la fièvre et persistent de 3 à 6 mois. Les anticorps anti-dengue détectés par les tests IHA apparaissent vers le 8e-10e jour et persistent durant plusieurs années. Les anticorps neutralisants et ELISA sont décelables dès le 6e-8e jour et persistent plusieurs dizaines d'années [Deubel, 1990; Chan et al., 1975]. Lors d'une infection secondaire, les IgM et les IgG apparaissent plus rapidement, vers le deuxième jour. La cinétique des anticorps de type IgA calque plus ou moins celle des IgM.

De nombreuses tentatives de fractionnement d'antigènes viraux ou d'utilisation de peptides comme sources d'antigènes visant à détecter des anticorps spécifiques de type ont échoué, par manque de spécificité ou souvent par manque de sensibilité, la réponse immunitaire étant largement dépendante de l'hôte et de la souche infectante. De plus, l'existence de nombreux épitopes conformationnels à la surface de la protéine d'enveloppe impose l'utilisation d'antigènes dans une conformation correcte.

Aucune méthode de diagnostic actuellement décrite ou actuellement sur le marché, qu'il s'agisse de test "dot blot" pour la détection des IgM mis sur le marché par Venture Technologies Sdn, (Malaisie) ou par Integrated Diagnostics, Inc. (1756 Sulphur Spring Road, Baltimore MD 21227, USA), ou les tests ELISA, capture IgM et IgG et immunochromatographie mis au point et commercialisés par la société PanBio Pty Ltd (116 Lutwyche road, Windsor K-4030 Australia) ou encore le test d'immunochromatographie mis sur le marché par Chembio Diagnostic Systems, Inc., 3661 Horseblock Road, Medford, NY 11763, USA), ne permettent de diagnostiquer avec une fiabilité suffisante le sérotype source

de l'infection ainsi que le caractère primaire ou secondaire de l'infection (Cardosa 1988, 1991 a, 1991b, 1992, 1993).

Les antigènes utilisés jusqu'à présent n'étant pas individualisés et purifiés, il était impossible de suivre la cinétique des anticorps IgM et IgG ou IgA dirigés contre la protéine supposée être la plus immunogène lors de l'infection ou de la vaccination par un flaviviridae.

Le diagnostic de dengue dans une zone d'endémicité forte où circulent plusieurs sérotypes doit répondre à plusieurs impératifs :

- une exigence technique fondée sur la rapidité, la sensibilité et la simplicité pour être effectuée sur le terrain ou au chevet du malade ;

- un impératif de spécificité pour typer le virus dans une zone endémique pour plusieurs arbovirus comme la dengue et l'encéphalite japonaise dans le sud-est asiatique ou comme la dengue et la fièvre jaune en Amérique du sud;

- une nécessité de pouvoir diagnostiquer chez un malade fébrile une arbovirose par la présence d'IgM ;

- une possibilité de diagnostiquer les IgA dont la cinétique de production et l'implication dans la réponse à l'infection et dans la pathogénie de la maladie n'ont pas été caractérisées ;

- une nécessité de distinction entre infections primaire et secondaire compte tenu de l'association possible entre une infection séquentielle et le risque de DHF.

Dans la demande de brevet WO 97/18311 citée plus haut, il a été montré que des polypeptides ou glycopeptides des différents sérotypes issus de la protéine E, préM, NS1, NS3, ou NS5 de flaviviridae, notamment de la dengue, pouvaient constituer d'excellents immunogènes, seuls ou en combinaisons, pouvant constituer un vaccin polyvalent contre le virus de la dengue.

La présente invention résulte des études réalisées avec les polypeptides recombinants de l'invention WO 97/18311. Ce polypeptide est

aisément purifiable dans la mesure où il comporte une délétion ayant pour avantage de donner naissance à une protéine soluble secrétée dans le compartiment extracellulaire de structure moléculaire proche sinon identique à celle de la protéine native. En outre, ces polypeptides sont
5 aisément purifiables du fait qu'ils comportent un résidu histidine ayant une spécificité particulière pour les colonnes de métal chélate.

La purification en grande quantité de ces protéines a permis, comme le montrent les expériences décrites ci-dessous, de montrer que ces polypeptides recombinants avaient une spécificité de reconnaissance,
10 tant pour les IgM que pour les IgG, des sérotypes responsables de l'infection, sans risquer d'obtenir des réactions croisées avec d'autres virus.

Les IgA détectées également tôt après l'infection, montrent le même type de spécificité.

L'invention porte donc sur l'utilisation de ces polypeptides ou
15 glycopeptides purifiés, issus de la protéine E, pre M, NS₁, NS₃, ou NS₅ de différents sérotypes de flaviviridae, dans la fabrication d'une trousse de diagnostic de la détermination du sérotype incriminé dans une infection par le virus de la dengue, ainsi qu'à la nature primaire ou secondaire de ladite infection. Plus particulièrement, les polypeptides ou glycopeptides utilisés
20 dans l'invention portent, à leur extrémité carboxylée, un résidu de 2 à 8 acides aminés choisis parmi l'histidine, le tryptophane ou la cystéine.

Tant pour les flaviviridae en général que pour les virus de la dengue en particulier, les polypeptides sont issus de la protéine E des 4 sérotypes 1, 2, 3, 4 dudit virus, ayant été délétés de façon préférentielle de
25 70 à 105 acides aminés à leur extrémité carboxylée. Cette délétion permet, lors de la production dans des lignées de diptères, d'obtenir une production par sécrétion permettant une extraction plus facile.

Les 4 sérotypes les plus répandus et à partir desquels on peut construire les polypeptides utilisés dans la fabrication d'une trousse de
30 diagnostic sont issus des souches FGA/89, JAM/83, PaH/881 et 63/632

respectivement pour les sérotypes 1, 2, 3 et 4. Un exemple particulier de ces polypeptides sont ceux qui comportent une délétion de 100 acides aminés et décrits dans la demande WO 97/18311.

5 La présente invention est également relative à une trousse de diagnostic de l'état primaire ou secondaire d'une infection par un ou plusieurs sérotypes du virus de la dengue et contenant au moins :

- un ou plusieurs polypeptides, peptides ou glycopeptides marqués ou non issus de la protéine E, pre M, NS₁, NS₃ ou NS5 de différents sérotypes de flaviviridae, notamment de la dengue, et purifiés, 10 par exemple s'ils portent à leur extrémité carboxylée un résidu de 2 à 8 acides aminés choisis parmi l'histidine, le tryptophane ou la cystéine ;
- des anticorps anti-IgG marqués, ou non,
- des anticorps anti-IgM marqués, ou non,
- des anticorps anti-IgA marqués ou non.

15 Les molécules polypeptidiques ou les anticorps peuvent être utilisés en milieu liquide. Ils sont préférentiellement fixés sur un support solide. Si un test "dot blot" est utilisé, les polypeptides ou les anticorps seront fixés sur des supports de type nitrocellulose ou polycarbonate.

20 Si un test ELISA est utilisé, les polypeptides ou les anticorps seront fixés sur des supports polypropylène ou polycarbonate. Si un test d'agglutination est utilisé, les polypeptides ou les anticorps seront fixés sur des supports type latex.

25 Si les polypeptides sont fixés sur le support, les anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM seront marqués ou modifiés. Si les anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM sont fixés sur un support, les polypeptides seront marqués ou seront révélés par des anticorps marqués ou modifiés, spécifiques de ces polypeptides.

30 L'homme du métier saura fixer le polypeptide obtenu et purifié, ou les anticorps, sur le support de son choix en fonction du type de test qu'il souhaite mettre en oeuvre. La fixation peut être réalisée par

adsorption ou peut être également une fixation covalente, par exemple, par l'intermédiaire de liaison carboxy-diimine. Les différents types de fixation par liaison covalente ou non de protéine sur les supports pour réaliser des tests spécifiques sont réalisés selon les techniques connues de l'homme de l'art (Johnstone and Thorpe, 1987).

Une trousse de diagnostic selon l'invention contient des anticorps dirigés contre des IgG, des IgA ou des IgM de préférence d'origine humaine afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité de la réaction avec l'antigène, le cas échéant, fixé sur un support solide. Les anti-IgG, les anti-IgA et les anti-IgM seront modifiés de telle façon qu'après avoir réagi simultanément avec les anticorps fixés sur les polypeptides spécifiques de chacun des sérotypes, les produits de la réaction soient détectés et discriminés. Autrement dit, les anticorps anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM sont modifiés chimiquement de façon différente de telle manière que les réactions antigène/anticorps humain-anti-anticorps modifié soient révélées respectivement par une molécule chimique susceptible d'émettre directement ou indirectement par action sur un substrat, un signal qui sera spécifique de la réaction IgG ou IgA antigène, d'une part, ou IgM antigène, d'autre part.

On entend par antigène n'importe lequel des quatre peptides comportant le cas échéant une délétion de 75 à 105 acides aminés dans la partie carboxyterminale pourvue d'un résidu de 2 à 8 acides aminés tel que décrit ci-dessus. Les antigènes peuvent être homogènes, c'est-à-dire ne concerner qu'un seul sérotype, ou hétérogènes, c'est-à-dire constitués d'un mélange d'au moins 2 sérotypes viraux.

Les polypeptides utilisés, selon le type d'antigène ou de support, pourront être utilisés à des concentrations comprises entre 1 ng/ml et 1 µg/ml.

Le signal spécifique permettant de détecter l'existence de la réaction antigène/anticorps ou anticorps-anti-anticorps est un signal de

toute nature habituel dans ce type de réaction, à savoir un signal de fluorescence, de luminescence, colorimétrique ou radioactif.

Une méthode particulière de modification chimique des anticorps ou polypeptides selon l'invention consiste, par exemple à coupler chimiquement un groupement biotiny, qui permet de coupler ensuite toute substance liée à la streptavidine. Le couplage peut encore être effectué par l'intermédiaire de la p-benzoquinone [FR N° 7537392 et brevet américain N° 4,925,921].

La spécificité réactionnelle des trousse de diagnostic comportant les antigènes décrits ci-dessus permet d'envisager la fabrication de différentes trousse qui peuvent être, soit des trousse de test rapide pour confirmer un diagnostic, soit des trousse de test de routine pour réaliser des enquêtes épidémiologiques.

De la même façon, les constructions décrites ci-dessus et illustrées par les exemples ci-dessous peuvent être transposées à l'expression et à la purification des protéines d'enveloppe E ou d'autres polypeptides des virus de l'encéphalite japonaise et de la fièvre jaune qui, à leur tour, pourront servir d'antigènes dans la fabrication d'une trousse de diagnostic des infections par ce même virus.

Les exemples ci-dessous, illustrés par les figures, montrent les performances particulières des trousse de diagnostic de la présente invention.

La figure 1 représente un western blot des protéines d'enveloppe des 4 sérotypes du virus de la dengue. L'anticorps monoclonal de souris 4G2 décrit dans Am. J. Trop. Med. Hygiene, 1982, n°3, p. 548-558 [Gentry et al., 1982] dirigé contre un épitope présent sur les protéines d'enveloppe des quatre sérotypes du virus de la dengue a été utilisé pour la révélation. Une alternative consiste à utiliser des anticorps polyclonaux préparés par hyperimmunisation de souris immunisées par les 4 sérotypes du virus de la dengue.

La figure 2 présente la réactivité sérologique de sérum de patients ayant présenté un épisode fébrile de dengue obtenu par "dot blot" sur des bandes de nitrocellulose.

La figure 3 présente la réactivité sérologique d'ascites de souris hyperimmunisées contre la Dengue 1 (HS1), la Dengue 2 (HS2), la Dengue 3 (HS3) et la Dengue 4 (HS4) ou de souris non immunisées (NS); vis-à-vis des polypeptides d'enveloppe de Dengue 1 (D1), Dengue 2 (D2), Dengue 3 (D3) et Dengue 4 (D4) dans un test de type "dot blot". C = Contrôle négatif.

Exemple 1 - Mise au point d'un test de dot-Blot pour le diagnostic sérologique de la dengue :

Nous avons choisi d'utiliser comme antigène la protéine d'enveloppe du virus, la protéine E, qui est la cible privilégiée de la réponse immunitaire humorale protectrice chez l'hôte infecté. Nous avons fait appel à la technologie du baculovirus pour la production de la protéine E des quatre sérotypes du virus de la dengue. Le gène de la protéine E a été manipulé afin qu'elle ne soit plus retenue dans les membranes intracellulaires mais sécrétée sous forme soluble dans le compartiment extracellulaire, de structure moléculaire proche sinon identique à celle de la protéine native, et plus purifiable comme le montre le protocole indiqué au point 1.2 ci-dessous. De plus, une séquence d'adhésion à des cations métalliques a été placée à la fin du gène des protéines E, limitant les étapes de purification chromatographique à partir des surnageants cellulaires [Staropoli et al., 1997].

1.1. Construction des gènes de la protéine d'enveloppe

Les gènes de la protéine E des quatre sérotypes du virus de la dengue ont été délétés d'une partie de leur séquence correspondant aux 100 derniers acides aminés (Δ E 100) de la protéine non préjudiciable au maintien de sa structure tridimensionnelle nécessaire pour la réactivité des anticorps neutralisants. Cette délétion a pour avantage de donner naissance à une protéine soluble sécrétée dans le compartiment

extracellulaire, de structure moléculaire proche sinon identique de celle de la protéine native, et plus facilement purifiable.

Les souches de virus de la dengue dont dérivent les gènes E sont celles présentées dans le tableau 2 de la demande n° WO 97/18311.

5 La préparation des gènes E a été réalisée par RT/PCR à partir des ARN extraits de cellules de moustique *Aedes pseudoscutellaris* AP61 infectées par les différents virus. Une séquence codant pour six résidus histidines a été placée à la fin des gènes de la protéine d'enveloppe. Les baculovirus recombinés AcD(1,2,3 ou 4)EÆ100His6 ont été obtenus par recombinaison homologue dans les cellules *Spodoptera frugiperda* Sf9
10 entre les vecteurs navettes pVLD(1,2,3 ou 4)EÆ100His6 et le baculovirus AcRP23lacZ. Le profil électrophorétique des quatre protéines E recombinées correspondant aux virus de la dengue 2, 3 ou 4 indique une masse moléculaire apparente d'environ 50 kDa et de 52 kDa pour la dengue 1 (Fig.1). Ces protéines sont glycosylées et leur masse moléculaire
15 diminue d'environ 4 kDa après traitement aux endoglycosidases. Il semblerait que les deux sites de N-glycosylation de la protéine E du virus de la dengue 1 soient occupés alors qu'un seul des deux sites potentiels le soit pour les virus des trois autres sérotypes. Les protéines E subissent
20 une modification de leur sucres dans la voie sécrétoire qui deviennent résistants à l'endoglycosidase H sur les protéines extracellulaires.

1.2. Purification de la protéine E par chromatographie d'affinité sur colonne d'ion métallique

25 La présence de six résidus histidine à l'extrémité C-terminale tronquée de la protéine d'enveloppe lui confère la propriété de pouvoir se fixer sur des cations divalents type Ni^{++} ou Co^{++} et d'être purifiée à partir de lysats cellulaires en une seule étape. Le groupement histidine semble immunologiquement inerte et peut être maintenu sur la protéine purifiée pour les immunisations. L'étape de fixation de la protéine d'intérêt

sur le support cationique est déterminante du rendement de purification et nécessite la récupération du surnageant cellulaire à un temps approprié avant la lyse cellulaire et un traitement approprié pour concentrer la protéine et lui préserver son état natif. Deux méthodes de concentration ont été testées, soit par précipitation de la protéine au sulfate d'ammonium à 40%, soit par ultrafiltration. Ces deux procédés permettent de concentrer la protéine d'environ dix fois et nécessitent une étape de dialyse pour éliminer les ions compétiteurs du milieu extracellulaire et apporter à la solution un pH et une condition saline compatible avec la chromatographie sur cation immobilisé. Après agitation douce de la résine cationique dans la solution protéique, la résine est placée dans une colonne de chromatographie et lavée avec une solution saline. La protéine est éluée de la résine en condition non dénaturante à l'aide de solution saline contenant 50 mM d'imidazole. La protéine éluée présente en général un degré de pureté supérieur à 95%. La protéine est finalement dialysée contre du PBS.

Les quantités de protéines produites, bien que différentes selon le sérotype, sont suffisantes pour envisager la production en masse de protéines sous-unitaires.

1.3. Test sérologique

a) avec des souris hyperimmunisées

Les protéines E pour chaque sérotype ont été calibrées en dot-blot [Cardosa et al., 1991 b] par dilutions limites vis-à-vis d'un anticorps monoclonal de groupe 4G2. Comme antigène témoin négatif, nous avons utilisé le même procédé de purification en partant d'un surnageant de cellules Sf9 infectées par un baculovirus sauvage. La dilution choisie pour cet "antigène témoin négatif" est celle correspondant à la moyenne des dilutions déterminée pour chaque sérotype. Les protéines diluées dans du PBS sont déposées sur une membrane de nitrocellulose par aspiration à l'aide d'un manifold. La concentration d'antigène est déterminée par dilutions limites vis-à-vis de l'anticorps 4G2 et la dilution choisie pour

chaque antigène est deux fois inférieure à celle donnant une réponse positive. La membrane est séchée pendant 30 minutes à 37°C puis préincubée dans du tampon auquel est rajouté 5% de lait écrémé déshydraté. Chaque bandelette de nitrocellulose contenant les quatre antigènes de dengue et l'antigène témoin est incubée dans une dilution au 1/40e d'ascites de souris hyperimmunisées contre la dengue ou de sérum de patient dans le tampon d'incubation. Les anticorps sont révélés par des anti-IgG de souris ou des anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humains marqués à la biotine. La biotine est ensuite captée par de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline. L'enzyme est enfin révélée par un substrat.

Le tableau 1 et la Figure 3 indiquent les résultats obtenus lorsque les bandelettes de nitrocellulose sont incubées avec les ascites de souris. Il apparaît dans cette expérience que :

- l'ascite de souris hyperimmunisée contre la dengue 1 (HS1) reconnaît seulement l'antigène correspondant (D1) mais les autres ascites reconnaissent à des degrés divers tous les antigènes;
- l'ascite de souris non hyperimmunisée (NS) ne reconnaît pas les antigènes de la dengue (D1, D2, D3, D4) et l'antigène préparé à partir de baculovirus sauvage (c) n'est pas reconnu par les ascites de souris hyperimmunisées contre la dengue.

Tableau 1: Réactivité sérologique par "dot-blot" des ascites de souris vis-à-vis des protéines d'enveloppe recombinantes des quatre sérotypes du virus de la dengue.

Ascites de souris	Antigènes				
	D1	D2	D3	D4	Témoin (c)
Dengue 1 (HS1)	3+	-	-	-	-
Dengue 2 (HS2)	3+	3+	1+	2+	-
Dengue 3 (HS3)	1+	-	2+	1+	-
Dengue 4 (HS4)	1+	2+	1+	2+	-
Témoin (NS)	-	-	-	-	-

b) avec des sérums humains

Nous avons testé 12 paires de sérums de patients atteints de dengue. Les résultats sont indiqués dans le tableau 2 et dans la figure 2.

Ce test permet d'avancer certaines remarques :

- Aucun bruit de fond n'est observé en utilisant des protéines purifiées.
- Le test "dot-blot" montre des réactions plus spécifiques du virus de la dengue 1 pour des réactions suspectées primaires de dengue 1 par la méthode IHA (titre ≤ 320) alors qu'elles sont tétravalentes chez des patients présentant une infection sans doute secondaire de dengue 1 ou de dengue 3 (IHA > 320).
- Les sérums ont été testés pour la présence d'IgM. Les IgG compétiteurs ont été préalablement absorbés sur un produit "absorbant RF" (Behring). La réaction se révèle positive et spécifique du sérotype pour les malades atteints de Dengue 1 primaire mais faible ou nulle et non spécifique du sérotype viral chez les malades atteints de Dengue secondaire.

Les résultats de détection des IgM sont reportés dans le tableau 3. Il apparaît que le diagnostic des IgM est suffisant dans le cas d'une infection primaire pour confirmer l'infection récente et le sérotype viral. La sensibilité pourra être améliorée car le sérum prélevé en phase aiguë de la maladie présente un résultat négatif ou faiblement positif (tableau 3).

Par ailleurs, les sérums de patients supposés présenter une dengue secondaire ont des taux faibles d'IgM non détectables dans l'état actuel de notre technique. Le faible taux d'IgM dans les réactions secondaire de la dengue est un phénomène connu.

Dans une autre série de tests ELISA, la présence d'IgA spécifique de la dengue a été observée, parallèlement à la présence d'IgM, dans les sérums de patients atteints de dengue.

18

Tableau 2. Réactivité sérologique de sérums de patients ayant présenté un épisode fébrile de dengue.

Sérum	D1				D2				D3				D4				Conclusion (basée sur le DOT-ELISA)
	IHA		DB		IHA		DB		IHA		DB		IHA		DB		
	SN	DB	SN	DB	SN	DB	SN	DB	SN	DB	SN	DB	SN	DB			
A1*	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	DEN1 prim
A2	320	2+	<40	-	40	-	<40	-	40	-	40	-	80	-	<40	-	
B1	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	DEN1 prim
B2	80	2+	80	-	40	-	40	-	80	-	<20	-	80	-	<20	-	
C1	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	<20	-	DEN1 prim
C2	160	3+	40	-	40	-	<20	-	80	-	<20	-	80	-	<20	-	
D1	<20	-	<20	1+	<20	1+	<20	-	<20	-	<20	-	<20	1+	<20	1+	DEN? sec
D2	1280	3+	320	3+	1280	3+	<320	3+	1280	3+	<320	3+	1280	3+	<320	3+	

E1	<20	NT	-	<20	NT	1+	<20	NT	0	NT	-
E2	160	160	3+	80	80	2+	80	80	0	80	1+
											DEN1 prim ?
F1	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	0	<20	-
F2	320	80	3+	80	<80	1+	160	<80	0	<80	-
											DEN1 prim
G1	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	<20	<20	-
G2	80	40	3+	40	40	1+	80	40	40	<40	-
											DEN1 prim ?
H1	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	<20	<20	-
H2	1280	320	3+	1280	<320	3+	1280	<320	1280	<320	3+
											DEN ? sec
I1	20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	<20	<20	-
I2	640	NT	2+	320	NT	1+	640	NT	320	NT	-
											DEN1 prim ?
J1	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	<20	<20	-
J2	160	NT	3+	20	NT	-	160	NT	40	NT	-
											DEN1 prim

20

K1	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	-	-	-
K2	1280	80	3+	1280	80	3+	1280	640	3+	1280	320
											DEN ? sec
L1	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20	-	<20	<20
L2	320	80	2+	320	80	2+	320	320	2+	320	20
											DEN ? sec

DEN : antigène du virus de la dengue

IHA : inhibition de l'hémagglutination (inverse de la dilution du sérum); SN†: séroneutralisation (inverse de la dilution du sérum); DB: dot-blot IgG (intensité de la coloration à la dilution 1/40e du sérum))

*1 signifie premier sérum pris en phase aiguë de la maladie et 2 signifie deuxième sérum prélevé 10-15 jours plus tard en période de convalescence

? : présomption d'une infection primaire ou secondaire par le virus de la dengue

DEN ? : le sérotype infectant responsable de la maladie ne peut pas être déterminé par la technique DOT-ELISA (les sérums K et L sont issus de patients atteints de dengue 3 (isolement viral).

21

Tableau 3 : Etude comparative de la réactivité sérologique des IgG et des IgM dans le sérum de malades de la Dengue par la méthode DOT-ELISA

Sérums	DOT ELISA				MAC ELISA	CONCLUSION
	D1	D2	D3	D4		
	IgG/IgM	IgG/IgM	Ig IgM	IgG/IgM		
A1	-/-	-/-	-/-	-/-	+	(basée sur le DOT-ELISA IgM et IgG
A2	2+/2+	-/-	-/-	-/-	+	
B1	-/-	-/-	-/-	-/-	+	D1 prim
B2	2+/2+	-/-	-/-	-/-	+	
C1	-/-	-/-	-/-	-/-	-	D1 prim
C2	3+/3+	-/-	-/-	-/-	+	

22

D1	-/-	1+/1+	-/1+	1+/-	-	
D2	3+/-	3+/1+	3+/1+	3+/1+	+	D sec
E1	-/-	1+/-	-/-	-/-	+	
E2	3+/3+	2+/-	1+/-	1+/-	+	D1 prim
F1	-/-	-/-	-/-	-/-	ND	
F2	3+/-	1+/-	-/-	-/-	ND	D1 prim ?
G1	-/-	-/-	-/-	-/-	ND	
G2	3+/3+	1+/-	1+/-	1+/-	ND	D1 prim
H1	-/-	-/-	-/-	-/-	ND	
H2	3+/-	3+/-	3+/-	3+/-	ND	D sec
I1	-/-	-/-	-/-	-/-	+	
I2	2+/2+	1+/-	-/-	-/-	+	D1 prim

23

J1	-/-	-/-	-/-	-/-	+
J2	3+/1+	-/-	-/-	-/-	+

Les légendes correspondent à celles mentionnées dans les figures 1 et 2

Technique de Mac-ELISA: Kuno et al., 1991

CONCLUSIONS

Nous avons démontré qu'il était possible d'élaborer un test rapide de la dengue qui pourrait permettre de différencier, dans le cas d'une infection par le virus de la dengue, une infection primaire d'une infection secondaire au même titre que l'IHA ou la séroneutralisation.

Les trousse de diagnostic selon l'invention permettent donc pour la première fois et de façon surprenante compte tenu qu'il s'agit d'antigènes synthétiques de tester de façon spécifique le sérum des patients lors d'infection primaire.

En outre, ce test permet de rechercher la spécificité d'IgM ou d'IgA dont la présence a été révélée dans un test classique de MAC ELISA.

D'autres techniques simples et rapides utilisées dans certains laboratoires pour le diagnostic des flaviviridae et en particulier du virus de la dengue ou d'autres virus (hémolyse radiale, agglutination, inhibition de l'agglutination, immunochematographie etc...) [Thongcharoen, et al., 1993 ; Henchal et Putnak, 1990, Cardosa, 1991, 1992] sont directement transposables aux protéines natives purifiées, recombinantes ou aux peptides synthétiques.

Les avantages pressentis dans l'utilisation de polypeptides recombinants, de protéines natives ou naturelles ou de peptides synthétiques comme, dans ce test, la protéine d'enveloppe sont :

- l'étude des cinétiques d'apparition des anticorps de type IgG, IgA et IgM,

- le faible taux ou l'absence de réactions croisées entre les virus du même groupe par l'utilisation d'antigènes natifs et purifiés,

- l'absence de fausses réactions positives rencontrées lors de l'utilisation d'extraits cellulaires ou de surnageants cellulaires bruts.

Références :

- Monath TPHeinz FX (1996): Flaviviruses. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley and e al. (eds.): "Fields Virology" Philadelphia: Lippincott-Raven Press Publishers,
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EGBrandt WE (1989): Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology* 70:37-43
- Pierre V, Drouet MTDeubel V (1994): Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. 145:93-104.
- Thongcharoen P, Wasi CPuthavathana P (1993): Dengue virus. In T Thongcharoen (eds.): "Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever" World Health Organization, pp104-120.
- Deubel V (1990): Le virus de la dengue. *Technique et Biologie* 5:126.
- Chan Y, Tech SAs S (1975): Staphylococcal agglutination reaction; a rapid and simple test for dengue antibodies. *Singapor Medical Journal* 16:194-195.
- Staropoli I, Frenkiel M, Mégret FDeubel V (1997): Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. in press.
- Cardosa MJ, Hah FL, Choo BH (1993): Screening of pig sera for antibodies to Japanese encephalitis virus using a dot enzyme immunoassay and IgM capture ELISA: comparison with the hemagglutination inhibition and plaque reduction neutralization tests. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*. 24:472-6
- Cardosa MJ, Tio PH, Nimmannitya S, Nisalak A, Innis B (1992): IgM capture ELISA for detection of IgM antibodies to dengue virus: comparison

of 2 formats using hemagglutinins and cell culture derived antigens. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health. 23:726-9

Cardosa MJ. Zuraini I (1991 a): Comparison of an IgM capture ELISA with a dot enzyme immunoassay for laboratory diagnosis of dengue virus infections. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health. 22:337-40

Cardosa MJ. Tio PH (1991 b): Dot enzyme immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. Bulletin of the World Health Organization. 69:741-5

Cardosa MJ. Hooi TP. Shaari NS (1988): Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: a sensitive method for the detection of antidengue antibodies. Journal of Virological Methods. 22:81-8

Henchal, E.A. and Putnak, J.R. (1990): The dengue viruses - Clinical Microbiology Reviews, 3: 376-96.

Kuno, G.; Gonez, I., Gubler, D.J. (1991): An Elisa procedure for the diagnosis of dengue infections - Journal of Virological Methods. 33:101-113.

Marin, M.S. de A. Zanotto, P.M., Gritsun, T.S. Gould E.A. (1995). Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus Flavivirus - Virology, 206 : 1133-1134

Gentry, M.K., Henchal, E.A., Mc Cown, J.M., Brandt, W.E., DALRYMPLE, J.M. (1982). Identification of distinct antigenic determinants on Dengue-2 virus using monoclonal antibodies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 31: 548-555.

Johnstone A. And Thorpe R. Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1987, London, U.K.

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation d'un ou plusieurs polypeptides ou glycopeptides purifiés issus de la protéine E, pre M, NS₁, NS₃ ou NS₅, de différents sérotypes de flaviviridae, notamment de la dengue, à la fabrication d'une trousse de diagnostic de la détermination du sérotype incriminé dans une infection et à la nature primaire ou secondaire de ladite infection.

10 2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le ou les polypeptides ou glycopeptides purifiés portent à leur extrémité carboxylée un résidu de 2 à 8 acides aminés choisis parmi l'histidine, le tryptophane ou la cystéine.

15 3. Utilisation selon la revendication 2 caractérisée en ce que les polypeptides sont issus de la protéine E des quatre sérotypes du virus de la dengue et ont été délétés de 70 à 105 acides aminés à leur extrémité carboxylée.

20 4. Utilisation selon la revendication 3 caractérisée en ce que les polypeptides sont issus de la protéine E des souches FGA/89, JAM/83, pah 881 et 63632 respectivement pour les sérotypes 1, 2, 3 et 4.

25 5. Utilisation selon les revendications précédentes caractérisée en ce que les polypeptides sont solubles ou fixés sur un support solide apte à être utilisé dans un test sérologique, ledit test étant choisi parmi les tests ELISA, DOT-BLOT, inhibition de l'héماغلutation, hémolyse radiale, agglutination, immunochromatographie.

6. Trousse de diagnostic de l'état primaire ou secondaire d'infection par un ou plusieurs sérotypes du virus de la Dengue, caractérisée en ce qu'elle contient au moins :

- un ou plusieurs polypeptides ou glycopeptides issus de la protéine E, pre M, NS₁, NS₃ ou NS₅ de différents sérotypes de flaviviridae, notamment

de la dengue, et portant à leur extrémité carboxylée un résidu de 2 à 8 acides aminés choisis parmi l'histidine, le tryptophane ou la cystéine ;

- des anticorps anti-IgG marqués ou modifiés ;

- des anticorps anti-IgM marqués ou modifiés ;

5 - des anticorps anti-IgA marqués ou modifiés.

7. Trousse selon la revendication 6 caractérisée en ce que les polypeptides ou les anticorps sont fixés sur un support solide ou solubles.

8. Trousse selon l'une des revendications 6 ou 7 caractérisée en ce que les polypeptides sont issus de la protéine E des quatre sérotypes et
10 ont été délétés de 70 à 105 acides aminés à leur extrémité carboxylée.

9. Trousse selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisée en ce que le ou les polypeptides ou glycopeptides sont marqués et les anticorps anti-IgG, anti-IgM et anti-IgA sont non marqués.

10. Trousse selon l'une des revendications 6 à 9 caractérisée en
15 ce que les IgG, les IgA et les IgM sont des immunoglobulines humaines ou animales.

11. Trousse selon l'une des revendications 6 à 10 caractérisée en ce que les anticorps anti-IgG, anti-IgA et anti-IgM sont modifiés de telle façon que des réactions simultanées des IgG, des IgA et des IgM sur les
20 polypeptides, le cas échéant fixés sur un support solide, soient détectées et discriminées.

12. Trousse selon la revendication 11 caractérisée en ce que les anti-IgG, les anti-IgA et anti-IgM sont modifiées chimiquement, et les réactions sont révélées respectivement par une molécule chimique
25 susceptible d'émettre directement, ou indirectement par action sur un substrat, un signal spécifique.

13. Trousse selon la revendication 12 caractérisée en ce que le signal est un signal de fluorescéine, luminescence, colorimétrique, radioactif.

14. Antigène purifié spécifique des flaviviridae comprenant un polypeptide ou glycopeptide marqué issu de la protéine E, pre M, NS₁, NS₃ ou NS₅ d'un virus de la famille des flaviviridae.



FIGURE 1

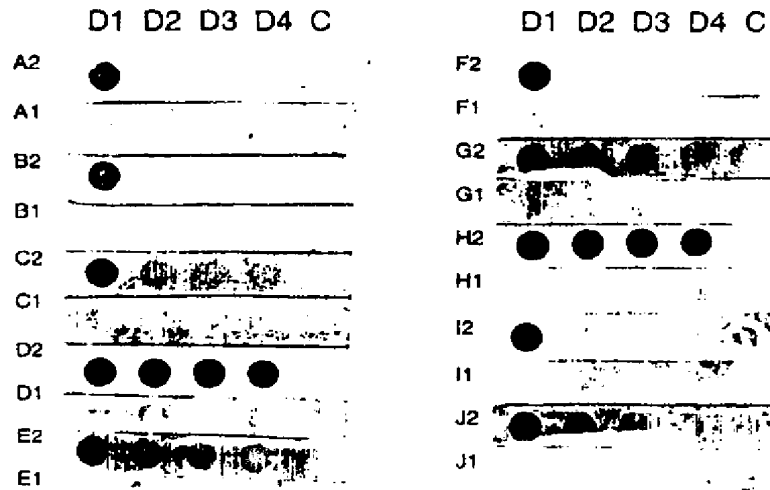


FIGURE 2

3/3

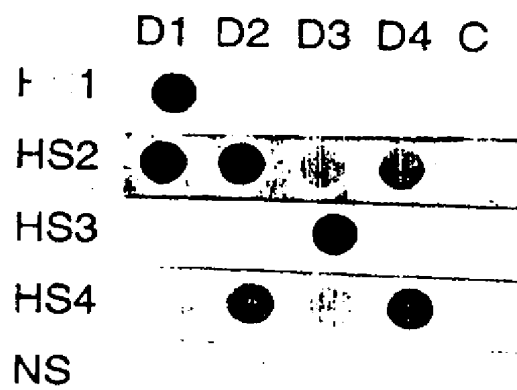


Figure 3

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 546938
FR 9710403

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	WO 97 18311 A (PASTEUR INSTITUT ; DEUBEL VINCENT (FR); STAROPOLI ISABELLE (FR)) * le document en entier *	1-14
X	WO 93 22440 A (UNIV SINGAPORE ; TAN YIN HWEE (SG); FU JIANLIN (SG); TAN BOON HUAN) * page 5, ligne 4 - page 6, ligne 2; revendications 1,9-13,16,17 *	1,14
X	WO 96 37221 A (HAWAII BIOTECH GROUP) * page 20, ligne 20 - page 21, ligne 29; exemple 7 *	1,14
X	FR 2 665 710 A (PASTEUR INSTITUT) * page 7, ligne 12 - page 8, ligne 6; revendications 10,11 *	1,14
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 002, 29 février 1996 & JP 07 265093 A (CHEMO SERO THERAPEUT RES INST; OTHERS: 01), 17 octobre 1995, * abrégé *	1,14
E	EP 0 800 084 A (IMMUNO GMBH) 8 octobre 1997 * le document en entier *	1,14
A	RUGGLI N ET AL: "BACULOVIRUS EXPRESSION AND AFFINITY PURIFICATION OF PROTEIN E2 OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS STRAIN ALFORT/187" VIRUS GENES, vol. 10, no. 2, 1 janvier 1995, pages 115-126, XP000577157 * le document en entier *	2,6,14
-/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 avril 1998		Hart-Davis, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1501 (01/92) (P4/C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 546938
FR 9710403

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	G. KUNO ET AL.: "An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 33, 1991, pages 101-113, XP002061033 * le document en entier *	1
A	A. I. BARTHOLOMEUSZ, P. J. WRIGHT: "Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5" ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 128, no. 1-2, 1993, pages 111-121, XP002061596 * le document en entier *	1,6,14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 avril 1998		Hart-Davis, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.92 (P44C13)